Journal of Water and Soil
https://jsw.um.ac.ir

Research Article
Vol. 36, No. 1, March-April 2022, p. 53-65

Effect of Bacterial Surfactant along with Application of Chelators on Soluble Cadmium in a Calcareous Soil

S. Arabteymori[1], A. Halajnia[2]*, A. Lakzian[3], F. Nikbin[4]

Received: 24-07-2021 Revised: 05-09-2021 Accepted: 11-11-2021 Available Online: 22-05-2022	**How to cite this article:** Arabteymori S., Halajnia A., Lakzian A., and Nikbin F. 2022. Effect of Bacterial Surfactant along with Application of Chelators on Soluble Cadmium in a Calcareous Soil. Journal of Water and Soil 36(1): 53-65. (In Persian with English abstract) **DOI:** 10.22067/JSW.2021.71126.1063

Introduction

Surfactants as surface-active substances with combined hydrophobic and hydrophilic properties are widely used in various fields. In soil remediation processes these substances can be used to increase the availability of organic and inorganic contaminants to improve microbial decomposition of organic pollutants or heavy metals adsorption. In recent years, researchers have been seeking to produce and use surfactants that are more environment friendly. In this regard, produced biosurfactants by microorganisms are of special importance due to their environmental benefits. Microorganisms produce a wide range of biosurfactants. Biosurfactants are extracellular compounds that can combine with metals such as zinc, copper, and cadmium and can increase the solubility of these metals and reduce their toxicity. Negatively charged anionic biosurfactants such as rhamnolipids and lipopeptides can increase heavy metals availability by combining to metals and changing the properties of soil solution. In this study, the effect of surfactant application from *Pseudomonas putida* and *Bacillus subtilis* and some chelators include sodium citrate, humic acid and Na_2-EDTA on soluble cadmium in a contaminated calcareous soil was investigated.

Materials and Methods

This study was conducted as factorial in a completely randomized design in laboratory conditions at several steps separately. A calcareous soil sample was contaminated with 15 mg kg^{-1} cadmium from the source of Cd $(NO_3)_2$. Contaminated soil incubated for 4 weeks at field capacity. Acid deposition method was used for surfactant extraction from culture medium of *Pseudomonas putida* KT-2440 and *Bacillus subtilis* 1795. The structure of extracted biosurfactants was investigated by FTIR. Equilibrium time was obtained by determining the amount of soluble cadmium at times 6, 12, 24, 36, 72 hours by adding 1mM sodium citrate, humic acid and Na_2-EDTA to the contaminated soil (ratio of 1 to 5 soil to solution).

The concentrations of 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1 and 2 mM of humic acid, sodium citrate and Na_2-EDTA were used to determine the appropriate concentration of each chelator. To investigate the interaction of chelators and biosurfactants on soluble cadmium, an experimental was conducted as a completely randomized design with factorial arrangement design. Experimental treatments consisted of three types of chelating agents (sodium citrate, humic acid, Na_2-EDTA and control), two types of surfactants from *Pseudomonas putida* and *Bacillus subtilis*, and five concentration levels of the biosurfactants (0, 25, 50, 100 mg L^{-1}).

Results and Discussion

The highest amount of soluble cadmium (11.59 mg L^{-1}) was observed in Na_2-EDTA treatment at 72 hours, which was significant compared to the other treatments. The lowest amount of soluble cadmium was obtained through application of sodium citrate (0.205 mg L^{-1}) at 36 hours. In all studied concentrations, Na_2-EDTA had the greatest effect and sodium citrate had the least effect on soluble cadmium. While the use of Na_2-EDTA at all concentrations caused a significant increase in soluble cadmium, sodium citrate had no significant effect on

1, 2, 3 and 4- Graduate M.Sc. Student, Assistant Professor, Professor and Laboratory Expert Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, respectively.
(*- Corresponding Author Email: halajnia@um.ac.ir)

soluble cadmium at studied concentrations. Humic acid at concentrations higher than 0.5 mM significantly increased the soluble cadmium. Increasing the concentration of humic acid and citrate from 1 to 2 mM did not show any significant impact on soluble cadmium. At all levels of biosurfactant application, Na_2-EDTA and humic acid caused a significant increase in soluble cadmium concentration. In control and sodium citrate treatments, application of biosurfactants did not cause significant difference in the concentration of soluble cadmium. The highest amount of soluble cadmium was obtained as a result of the application of *Bacillus subtilis* surfactant and Na_2-EDTA. However, increasing the concentration of *Bacillus subtilis* surfactant from 25 to 100 mg L^{-1} had no significant effect on increasing the efficiency of Na_2-EDTA. *Pseudomonas putida* surfactant had no significant effect on soluble cadmium in Na_2-EDTA application. While in humic acid treatment, the application of the *Pseudomonas putida* surfactant at the highest concentration (100 mg L^{-1}) increased the concentration of soluble cadmium. Using *Bacillus subtilis* surfactant did not have effect on soluble cadmium in application of humic acid.

Conclusion

Among the studied chelators (sodium citrate, humic acid and Na_2-EDTA), Na_2-EDTA had the greatest effect on soluble cadmium. While sodium citrate had no significant effect on soluble cadmium. Surfactants from *Pseudomonas putida* and *Bacillus subtilis* had different effects on increasing the efficiency of studied chelators and soluble cadmium in the studied soil. In Na_2-EDTA and humic acid application, surfactant from *Bacillus subtilis* at a concentration of 25 mg L^{-1} and surfactant produced by *Pseudomonas putida* at a concentration of 100 mg L^{-1} had a significant effect on soluble cadmium, respectively. It seems using biosurfactants and chelators on increasing soluble cadmium in soil can be useful for phytoremediation purposes to increase its uptake by plant. However, further research is needed.

Keywords: *Bacillus subtilis*, Bioremediation, Cadmium, *Pseudomonas putid*, Soil pollution

نشریه آب و خاک
https://jsw.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۶، شماره ۱، فروردین- اردیبهشت ۱۴۰۱، ص ۵۳-۶۵

تأثیر سورفکتانت باکتریایی همراه با کاربرد کلات کننده‌ها بر کادمیم محلول در یک خاک آهکی

سحر عرب تیموری[۱]- اکرم حلاج نیا[۲]*- امیر لکزیان[۳]- فهیمه نیک بین[٤]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۰۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۰

چکیده

در این پژوهش تاثیر دو نوع سورفکتانت باکتریایی بر کادمیم محلول همراه با کاربرد سه نوع کلات کننده (اسید هیومیک، سیترات سدیم و Na_2-EDTA) در یک خاک آهکی آلوده به کادمیم در چند آزمایش جداگانه در شرایط آزمایشگاه بررسی شد. زمان تعادل در کاربرد غلظت ۱ میلی مولار کلات کننده‌ها در شش زمان (۶، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲ ساعت) و غلظت موثر هر یک از کلات کننده‌ها در کاربرد غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲mM تعیین گردید. درنهایت تاثیر کاربرد هم‌زمان هر یک از کلات کننده‌ها و دو نوع سورفکتانت استخراج شده از باکتری‌های *Pseudomonas putida* و *Bacillus subtilis* در غلظت‌های صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰mg L^{-1} بر کادمیم محلول بررسی شد. نتایج نشان داد با افزایش زمان تماس، کادمیم محلول خاک با کاربرد اسید هیومیک و Na_2-EDTA به صورت معنی‌داری ($p<0.05$) افزایش یافت. کاربرد Na_2-EDTA در همه غلظت-های مورد مطالعه و کاربرد اسید هیومیک در غلظت‌های بالاتر از ۰/۲۵mM موجب افزایش کادمیم محلول در مقایسه با شاهد شد. سیترات سدیم در هیچ یک از غلظت‌ها و زمان‌های مورد مطالعه تاثیر معنی‌داری بر کادمیم محلول نداشت. بیوسورفکتانت‌های مورد استفاده تاثیر معنی‌داری بر کارایی سیترات سدیم از نظر افزایش کادمیم محلول نداشتند. کاربرد سورفکتانت تولید شده بوسیله *Bacillus subtilis* در غلظت ۲۵mg L^{-1} همراه با Na_2-EDTA موجب افزایش کادمیم محلول گردید و افزایش غلظت این بیوسورفکتانت تاثیر معنی‌داری نسبت به غلظت ۲۵mg L^{-1} ایجاد نکرد. در حالی‌که کاربرد هم‌زمان Na_2-EDTA و سورفکتانت *Pseudomonas putida* تاثیری بر کادمیم محلول نداشت این بیوسورفکتانت در غلظت ۱۰۰mg L^{-1} اسید هیومیک موجب تفاوت معنی‌داری در غلظت کادمیم محلول خاک شد.

واژه‌های کلیدی: *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas putid*، آلودگی خاک، زیست‌پالایی، کادمیم

مقدمه

در حال حاضر روش‌های شیمیایی، فیزیکی و زیستی بسیاری برای اصلاح خاک‌های آلوده به فلزات سنگین وجود دارد (Broos *et al.,* 2005). وقتی غلظت فلزات سنگین بسیار کم است، روش‌های فیزیکی و شیمیایی بی‌اثر و پرهزینه خواهند بود. روش‌های زیستی مانند جذب زیستی یا تجمع زیستی برای حذف فلزات سنگین می‌تواند جایگزین خوبی برای روش‌های فیزیکی و شیمیایی باشد (Baker, 2000). زیست‌پالایی یکی از زمینه‌های تحقیقاتی نوین می‌باشد که طی سال‌های اخیر دستاوردهای شگرفی را به همراه داشته است. در طول سال‌های اخیر، تأکید ویژه‌ای بر گیاه‌پالایی شده است، زیرا می‌تواند برای احیاء خاک‌های آلوده به فلزات سنگین مورد استفاده قرار گیرد (Robinson *et al.,* 1997). از میکروب‌ها می‌توان جهت سمیت‌زدایی و تجزیه آلاینده‌ها و یا کمک به افزایش راندمان گیاه‌پالایی استفاده کرد. افزایش فراهمی آلاینده به ویژه فلزات سنگین موجب افزایش جذب آن توسط ریشه شده و در گیاه‌پالایی اهمیت زیادی دارد. در حالی‌که که فراهمی آلاینده در خاک می‌تواند به وسیله عوامل مختلف خاکی از جمله، مقدار و نوع رس‌ها، کربنات‌ها، مواد آلی و ... محدود شود. یکی از روش‌های افزایش فراهمی آلاینده‌ها در خاک جهت افزایش تجزیه میکروبی در مورد آلاینده‌های آلی و یا جذب در فلزات سنگین استفاده از سورفکتانت-

۱، ۲، ۳ و ۴- به‌ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، استادیار، استاد و کارشناس آزمایشگاه گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: halajnia@um.ac.ir)
DOI: 10.22067/JSW.2021.71126.1063

های سنتزی یا طبیعی است. بیوسورفکتانت‌ها به دلیل مزایای بالقوه نسبت به همتایان سنتزی خود در بسیاری از زمینه‌های زیست‌محیطی اهمیت ویژه‌ای دارند. ریزجانداران طیف وسیعی از بیوسورفکتانت‌ها را تولید می‌کنند. بیوسورفکتانت‌ها مشابه سیدروفورها ترکیبات خارج سلول می‌باشند که قادر به تشکیل کمپلکس با فلزاتی مانند روی، مس و کادمیم بوده و می‌توانند سبب افزایش حلالیت این فلزات و کاهش سمیت آن‌ها شوند (Rosa *et al.*, Makkar *et al.*, 2011 ; 2015). از مزایای عمده بیوسورفکتانت‌ها تنوع ساختاری، سمیت کم، تجزیه زیستی بیشتر، قابلیت عملکرد در محدوده وسیعی از pH، دما و شوری است (Rosa *et al.*, 2015; Makkar *et al.*, 2011). سورفکتانت باعث تجمع، افزایش حلالیت و یا امولسیون انواع مختلف آلاینده‌های آلی و غیر آلی می‌شود (Gautam and Banat, 1995 ; Tyagi, 2006). یکی از مهمترین و رایج‌ترین کاربردهای بیوسورفکتانت‌ها در پالایش ترکیبات آلی مانند هیدروکربن‌ها افزایش فراهمی زیستی و تحرک آنها به هدف حذف آلاینده‌ها از طریق روش‌های تجزیه زیستی و یا آبشویی است (Das *et al.*, 2008 ; Patowary *et al.*, 2018; Volkering *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 2020). با این حال استفاده از بیوسورفکتانت‌ها در پالایش ترکیبات معدنی مانند فلزات سنگین، به منظور حذف یون‌ها در طی مراحل شستشو با بررسی ارتباط بین آمفیفیل‌ها[1] (ترکیبات شیمیایی دارای هر دو ویژگی آب دوستی و چربی دوستی) و یون‌های فلزی نیز مورد مطالعه قرار گرفته است. آمفیفیل‌ها قادر به تغییر شرایط فیزیکی و شیمیایی محلول یا تاثیر بر توزیع شیمیایی فلزات در میان فازهای مختلف آن هستند (Tiehm, 1994). مطالعات محدودی وجود دارد که بطور مستقیم اثر بیوسورفکتانت بر افزایش راندمان گیاه‌پالایی را بویژه در مورد فلزات سنگین بررسی کرده باشند. ون و همکاران (Wen *et al.*, 2009) تاثیر مثبت رامنولیپید[2] را در خاک‌های آلوده به Cd و Zn مورد بررسی قرار دادند. جاواکار و همکاران (Juwarkar *et al.*, 2008) از بیوسورفکتانت دی رامنولیپید تولید شده توسط *Pseudomonas aeruginosa* BS2 برای حذف فلزات سنگین از خاک آلوده استفاده کردند. برخی مطالعات نشان می‌دهد که بیوسورفکتانت‌ها در حذف آرسنیک از خاک‌های آلوده تحت شرایط قلیایی کارایی دارند (Wang and Mulligan, 2009). نتایج لیما و همکاران (Lima *et al.*, 2011) نشان داد که بیوسورفکتانت‌ها می‌توانند با موفقیت برای حذف همزمان فلزات سنگین و آلاینده‌های آلی استفاده شوند. در مطالعه سان و همکاران (Sun *et al.*, 2021) گزارش شد که بیوسورفکتانت تولید شده توسط *Pseudomonas* sp. نسبت به سورفکتانت‌های شیمیایی در فروشویی زیستی[3] فلزات سنگین از جمله کادمیم راندمان حذف بالاتری از خود نشان داد.

استفاده از کلات کننده‌ها نیز یکی از روش‌های افزایش فراهمی فلزات سنگین است. نتایج نشان می‌دهد که استفاده از اسید هیومیک در خاک‌های آلوده سبب افزایش فراهمی زیستی و تحرک فلزات می‌شود (Topcuoglu, 2012; Pizzeghello *et al.*, 2013). هرچند برخی دیگر از مطالعات نشان می‌دهد که مواد آلی توانایی اتصال به یون‌های فلزی را دارند و منجر به افزایش تثبیت آن‌ها می‌شوند (Zhang *et al.*, 2013). برونا آلیس گومز و همکاران (Bruna Alice Gomes *et al.*, 2016) عنوان کردند که با استفاده از اسید هیومیک در خاک می‌توان محتوای فلزات سنگین محلول را کاهش و محتوای فرم متصل به مواد آلی Cu^{2+}، Cd^{2+}، Zn^{2+} و Pb^{2+} را افزایش داد تا فعالیت، سمیت و زیست فراهمی آن‌ها در خاک کاهش یابد. EDTA یک عامل کلات کننده مصنوعی است که در کلات کردن فلزات و افزایش غلظت آن‌ها در قسمت‌های بالای گیاه مؤثر است (Zhang *et al.*, 2014; Luo et al., 2005). با این حال، در محیط‌زیست پایدار هستند (Nowack *et al.*, 2006). بارونا و همکاران (Barona *et al.*, 2001) مشاهده کردند که سرب، نیکل و روی پس از استفاده از EDTA متحرک‌تر بودند و احتمال آبشویی آن‌ها افزایش پیدا کرد.

با توجه به این که برخی تحقیقات نشان داده است که کلات کننده‌های طبیعی از قبیل سیترات سدیم احتمالا می‌توانند موجب افزایش کارایی بیوسورفکتانت‌ها می‌شوند (Gunawardana *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2002; Muhammad *et al.*, 2009). در این مطالعه اثر کاربرد همزمان سورفکتانت باکتری‌های *Pseudomonas putida*، *Bacillus subtilis* و کلات کننده‌های سیترات سدیم، اسید هیومیک و Na_2-EDTA بر کادمیم محلول مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به منظور بررسی اثر سورفکتانت باکتریایی بر کادمیم محلول با آرایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در شرایط آزمایشگاهی در چند مرحله به صورت جداگانه انجام شد. پس از هوا خشک‌کردن نمونه خاک مورد آزمایش و عبور از الک ۲ میلی‌متری، برخی از خواص فیزیکی و شیمیایی آن تعیین شد. بافت خاک به روش هیدرومتری (Gee and Bauder, 1979)، pH نمونه خاک در گل اشباع و هدایت الکتریکی در عصاره گل اشباع، کربن آلی به روش اکسایش با دی کرومات پتاسیم (Walkley and Black, 1934) و

1- Amphiphiles
2- Rhamnolipid
3- Bioleaching

کربنات کلسیم معادل به روش خنثی سازی با اسید (Loeppert and Suarez, 1996) اندازه گیری شد. نمونه خاک با نمک $Cd(NO_3)_2$ به میزان ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیم آلوده شد. برای ایجاد تعادل میان کادمیم و خاک نمونه‌ها به مدت ۴ هفته در آزمایشگاه قرار گرفتند و رطوبت خاک در حد ظرفیت زراعی نگه داشته شد.

برای تولید و استخراج بیوسورفکتانت، باکتری‌های *Pseudomonas putida* KT-2440، *Bacillus subtilis* 1795 که به ترتیب از دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد و مرکز کلکسیون قارچها و باکتری‌های صنعتی ایران تهیه شده بود، در محیط کشت حاوی KH_2PO_4(1 g)، $MgSO_4$ (0.1 g)، $CaCl_2$ (0.025 g)، $Na_2HPO_4.H_2O$ (1 g)،KCl (0.5g)،$FeSO_4.7H_2O$ (0.001g)، $NaNO_3$ (2 g) در لیتر و ۲ میلی‌گرم در لیتر محلول متشکل از عناصر کم مصرف $FeCl_3.6H_2O$ (60 mg)، $CuSO_4.5H_2O$ (590 mg)،$ZnSO_4.7H_2O$ (600 mg)، $COCl_2.6H_2O$ (60 mg)، $MnSO_4.H_2O$ (200 mg) و ۲۰ گرم گلوکز به عنوان منبع اصلی کربن و pH تنظیم شده ۷ به مدت پنج روز بر روی دستگاه شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس رشد داده شدند (Silva *et al.*, 2010).

برای تشخیص تولید بیوسورفکتانت از تست گسترش روغن استفاده شد. به این صورت که ۱۰۰ میکرولیتر از روغن خام به سطح ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر در یک ظرف پتری دیش اضافه شد تا یک لایه نازک ایجاد شود. سپس ۱۰ میکرولیتر از محیط کشت تلقیح شده با هر کدام از باکتری‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در مرکز لایه روغن به آرامی قرار داده شد. کنار رفتن لایه روغن و نمایان شدن آب در سطح پتری دیش نشان دهنده حضور بیوسورفکتانت است (Phulpoto *et al.*, 2020).

جهت استخراج و خالص‌سازی بیوسورفکتانت، محیط کشت حاوی باکتری به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد تا سلول‌های باکتری از محیط کشت حاوی سورفکتانت حذف شوند. سپس pH محلول رویی با استفاده از اسید کلریدریک به ۲ رسانده شد (Das *et al.*, 2008). پس از اسیدی کردن، محلول به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد تا رسوب بیوسورفکتانت ایجاد شود. سپس رسوب حاصله با سانتریفیوژ کردن با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس جدا شد. برای خالص-سازی بیوسورفکتانت، به رسوب ۵۰ میلی لیتر آب مقطر با pH=۷/۵ اضافه شد (Das *et al.*, 2008). سپس بیوسورفکتانت سه مرتبه با حجم مساوی از مخلوط کلروفوم–متانول با نسبت ۲ به ۱ استخراج شد. ساختار بیوسورفکتانت‌های استخراج شده به وسیله دستگاه FTIR مورد بررسی قرار گرفت.

جهت به دست آوردن زمان تعادل، هر یک از مواد سیترات سدیم، اسید هیومیک و Na_2-EDTA در غلظت یک میلی‌مول در لیتر تهیه و با نسبت ۱ به ۵ (۵ گرم خاک و ۲۵ میلی لیتر محلول) به خاک اضافه شدند. مقدار کادمیم در محلول در زمان‌های ۶، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۷۲ ساعت بعد از سانتریفیوژ کردن با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه و پس از عبور از کاغذ صافی، به وسیله دستگاه جذب اتمی مدل PG990 اندازه‌گیری شد.

جهت تعیین غلظت مناسب ترکیبات اسید هیومیک، سیترات سدیم و Na_2-EDTA در غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مول در لیتر تهیه و با نسبت ۱ به ۵ به خاک اضافه شدند. بعد از ۷۲ ساعت تکان دادن مقدار کادمیم در محلول به وسیله دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شد.

جهت بررسی اثر متقابل کلات کننده‌ها و بیوسورفکتانت‌ها بر کادمیم محلول، آزمایشی بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی شامل فاکتورهای نوع کلات کننده (سیترات سدیم، اسید هیومیک، Na_2-EDTA و شاهد) در مناسب‌ترین غلظت از آزمایش قبل، نوع بیوسورفکتانت (استخراج شده از باکتریهای *Pseudomonas putida* KT-2440، *Bacillus subtilis*) و غلظت بیوسورفکتانت (صفر، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) انجام شد. نسبت خاک به محلول ۱ به ۵ و زمان تعادل ۷۲ ساعت در نظر گرفته شد.

داده‌های آزمایش با استفاده از نرم‌افزار JMP 8 آنالیز و از آزمون LSD برای مقایسه میانگین‌ها در سطح معنی‌داری یک درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

بافت خاک مورد مطالعه sandy clay loam محتوی ۱۱/۲ درصد کربنات کلسیم معادل و ۰/۴۷ درصد کربن آلی، pH برابر ۷/۷، هدایت الکتریکی برابر ۳ دسی‌زیمنس بر متر بود.

بیوسورفکتانت‌های استخراج شده از هر دو باکتری در تست گسترش روغن به وضوح موجب پراکنده شدن روغن سطحی به کناره‌های ظرف شدند. ساختارهای سورفکتانت‌های تولید شده توسط باکتری‌های *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas putida* با استفاده از دستگاه FTIR[1] مشخص و در شکل‌های ۱ و ۲ به ترتیب آورده شده است.

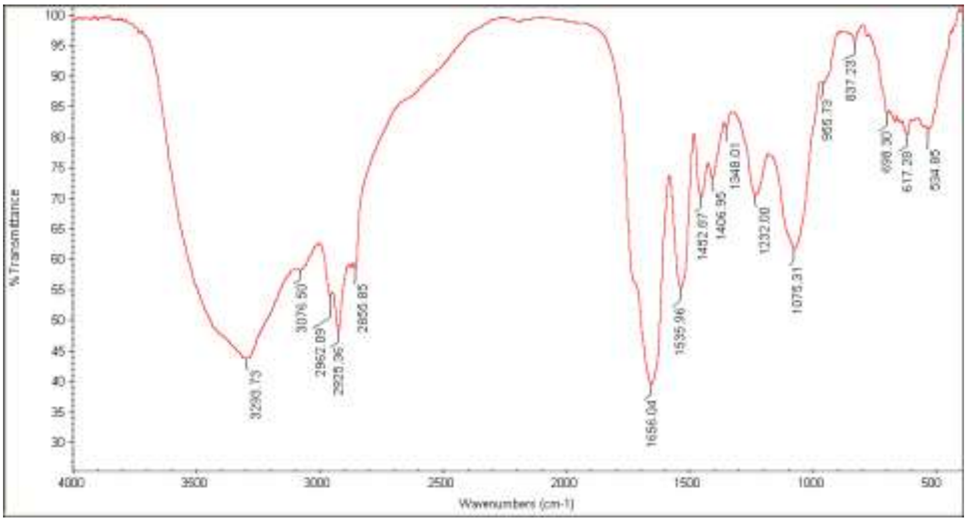
شکل ۱ نمودار حاصل از طیف‌سنجی لیپوپپتید را نشان می‌دهد. طیف cm^{-1} ۳۲۹۳ را می‌توان به ارتعاشات کششی N-H نسبت داد. طیف دیگر cm^{-1} ۲۹۶۲ و cm^{-1} ۲۹۲۵ مربوط به C-H (CH3,CH2) می‌باشد. طیف cm^{-1}۱۶۵۶ مربوط به گروه آمید CO-N است که

1- Fourier-Transform Infrared Spectroscopy

نشان دهنده حضور گروه‌های پپتید و کربوکسیل است که ماهیت لیپوپپتید را نشان می‌دهد. طیف $1406\ cm^{-1}$ و $1232\ cm^{-1}$ زنجیره آلیفاتیک را نشان می‌دهد. این تجزیه و تحلیل نشان می‌دهد که بیوسورفکتانت تولید شده، گروه‌های اصلی مشخصه یک مولکول سورفکتین را دارا می‌باشد و این بیانگر وجود هیدروکربن آلیفاتیک و همچنین پپتید است (Berreuter *et al.*, 2002).

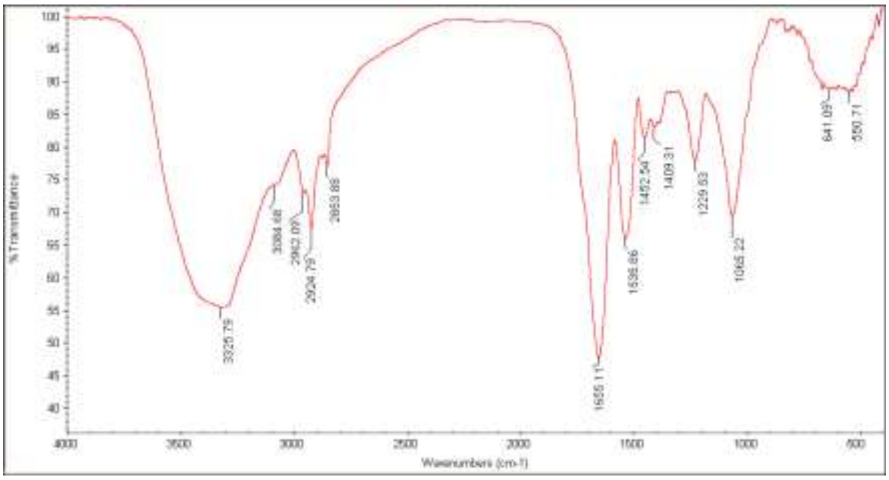
تجزیه و تحلیل ساختار رامنولیپید در شکل ۲ نشان داده شده است. طیف‌های cm^{-1} ۳۳۲۵، ۲۹۶۲ و ۲۹۲۴ نشان دهنده ارتعاشات کششی C-H موقعیت زنجیره هیدروکربن است. طیف ۱۶۵۵ مربوط به ارتعاشات کششی C = O گروه‌های کربونیل است. ارتعاشات ۱۵۳۵ نشان دهنده گروه‌های آلکیل در زنجیره هیدروکربن را نشان داد. طیف ۱۲۲۹ و ۱۰۶۵ مربوط به گروه C-O-C است. طیف‌های جذب مشخصه نشان می‌دهند که این بیوسورفکتانت یک گلیکولیپید است که حاوی حلقه های قند و زنجیره‌های طولانی هیدروکربن است (Pornsunthorntawee *et al.*, 2008).

شکل ۳ نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل نوع کلات کننده و زمان را نشان می‌دهد. بیشترین مقدار کادمیم محلول در تیمار EDTA و در زمان ۷۲ ساعت به مقدار ۱۱/۵۹ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد که در مقایسه با سایر تیمارها افزایش معنی‌داری را نشان داد.



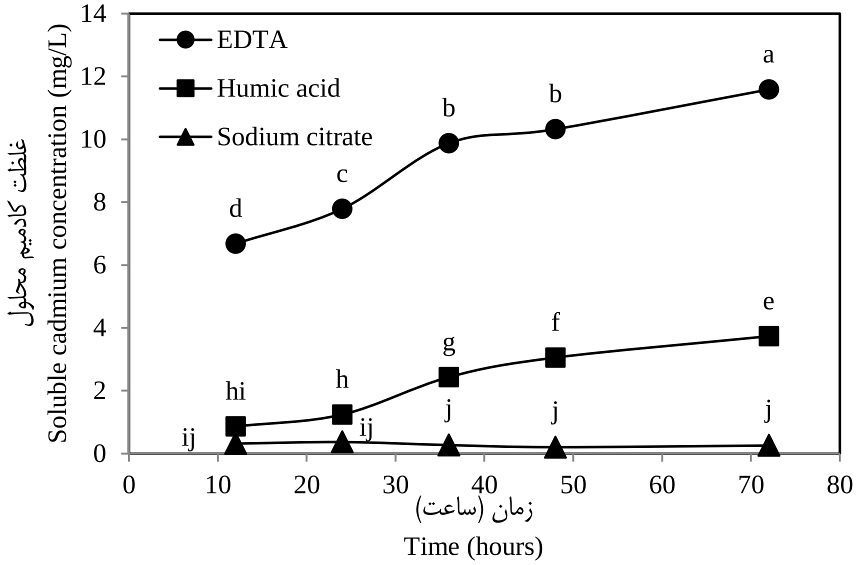
شکل ۱- طیف FTIR سورفکتانت تولید شده بوسیله *باسیلوس سابتلیس*

Figure 1- FTIR spectrum of produced surfactant by *Bacillus subtilis*



شکل ۲- طیف FTIR سورفکتانت تولید شده بوسیله *سودوموناس پوتیدا*

Figure 2- FTIR spectrum of produced surfactant by *Pseudomonas putida*



شکل ۳- اثر متقابل زمان و نوع کلات کننده بر غلظت کادمیم محلول (نسبت خاک به محلول: ۱ به ۵، غلظت کلات کننده: یک میلی‌مولار)

Figure 3- Interaction effect of time and type of chelator on the concentration of soluble cadmium (soil / solution ratio: 1:5, chelator concentration: 1 mM)

کمترین مقدار کادمیم محلول نیز در تیمار سیترات سدیم در زمان ۳۶ ساعت به مقدار ۰/۲۷۲۵ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد که البته مقدار کادمیم در این زمان با زمان‌های ۶، ۱۲، ۲۴ و ۷۲ ساعت اختلاف معنی‌داری نداشت. از بین سه نوع کلات کننده مورد استفاده در این تحقیق EDTA بیشترین تاثیر و سیترات سدیم کمترین مقدار تاثیر بر کادمیم محلول را داشتند. در دو کلات کننده EDTA و اسید هیومیک با افزایش زمان، مقدار کادمیم محلول افزایش معنی‌دار یافت (شکل ۳).

شکل ۴ نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل نوع و غلظت کلات-کننده بر مقدار کادمیم محلول را نشان می‌دهد. طبق این نتایج بیشترین مقدار کادمیم محلول در غلظت ۱ میلی‌مول بر لیتر کلات کننده EDTA (۱۱/۵۹ میلی‌گرم در لیتر) و کمترین مقدار کادمیم محلول نیز در غلظت ۰/۲۵ میلی‌مول بر لیتر کلات کننده سیترات سدیم (۰/۰۷۷ میلی‌گرم در لیتر) مشاهده شد. در همه غلظت‌های مورد آزمایش EDTA بیشترین تاثیر و سیترات سدیم کمترین تاثیر بر کادمیم محلول را داشتند. دو کلات کننده اسید هیومیک و EDTA در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌مول بر لیتر از نظر تاثیر بر کادمیم محلول تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. به همین دلیل برای بخش بعدی آزمایش یعنی تعیین تاثیر بیوسورفکتانت به همراه کاربرد کلات کننده‌ها از غلظت ۱ میلی‌مول در لیتر کلات کننده‌ها استفاده شد. در حالی که کاربرد EDTA در همه غلظت‌های مورد استفاده موجب افزایش قابل توجه و معنی‌دار کادمیم محلول شد. بین غلظت صفر و سایر غلظت‌های مورد استفاده سیترات سدیم اختلاف معنی‌داری از نظر تاثیر بر فراهمی کادمیم محلول وجود نداشت. اسید هیومیک در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار مقدار کادمیم محلول را نسبت غلظت صفر آن به طور معنی‌داری افزایش داد.

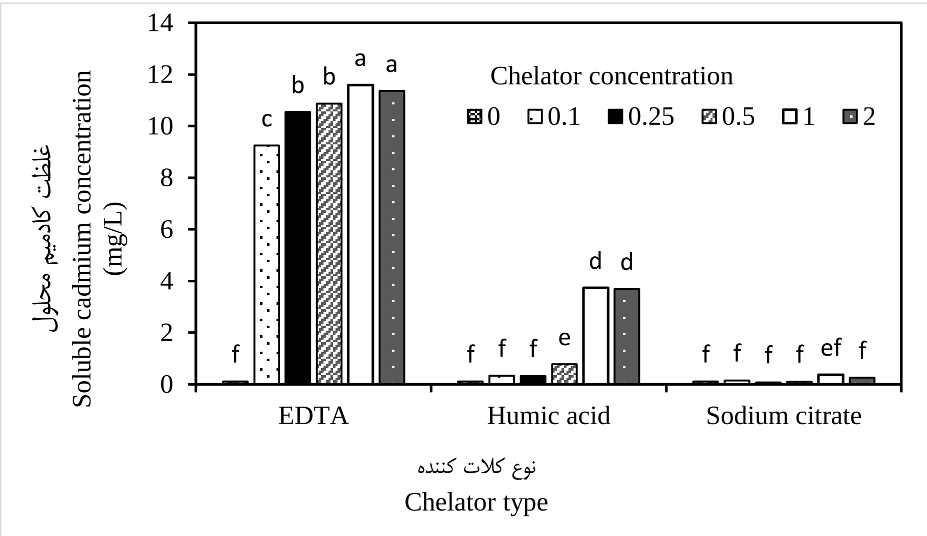
EDTA می‌تواند با ایجاد کمپلکس‌های محلول و پایدار با فلزات سنگین، موجب تحرک بالای فلزات سنگین در خاک شود. همانند نتایج بدست آمده از این تحقیق در مطالعات زیادی EDTA به عنوان کلات کننده‌ای که بیشترین تاثیر را بر افزایش حلالیت فلزات سنگین در خاک دارد معرفی شده است و این ترکیب به طور وسیعی برای استخراج فلزات سنگین از خاک‌های آلوده مورد استفاده قرار گرفته است (Luo *et al.*, 2005; Turgut *et* Babaeian *et al.*, 2016; *al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2014). بارونا و همکاران (Barona *et al.*, 2001) مشاهده کردند که میزان تحرک سرب، نیکل و روی پس از استفاده از EDTA و در نتیجه احتمال آبشویی آن‌ها افزایش پیدا کرد. در مطالعه‌ای که توسط لامبراشت و همکاران (Lambrechts *et al.*, 2011) انجام شد نشان دادند که افزودن EDTA به خاک آلوده به فلزات سنگین منجر به افزایش غلظت Cd و Zn در اندام‌های هوایی *Lolium perenne* شد و نقش مهمی در پالایش خاک‌های آلوده داشت. در مطالعات زیادی به اثر مثبت اسید سیتریک در افزایش فراهمی فلزات سنگین نیز اشاره شده است (Chen *et al.*, 2003; Turgut *et al.*, 2004). محمود و همکاران (Muhammad *et al.*, 2009) عنوان کردند که کاربرد EDTA و مقادیر مختلف اسید سیتریک به طور معنی‌داری باعث افزایش غلظت‌های کادمیم، سرب و کروم در اندام‌های هوایی گیاه *Typha angustifolia* در مقایسه با شاهد شد. طاهری پور و همکاران (Taheripur *et al.*, 2016) گزارش کردند کاربرد کلات‌های اسیدسیتریک و EDTA باعث

افزایش غلظت مس در اندام‌های هوایی ذرت شد و در این میان EDTA موثرتر از اسیدسیتریک بود. حسینی و همکاران (Hosseini et al., 2017) نیز گزارش کردند که EDTA نسبت به اسید سیتریک عامل کلات کننده موثرتری برای افزایش غلظت سرب محلول خاک بود.

این در حالی است که در این تحقیق سیترات سدیم به عنوان کلات کننده تاثیر معنی‌داری بر فراهمی کادمیم نداشت. تفاوت در نتایج به دست آمده می‌تواند ناشی از عدم تفکیک اثر کلات کنندگی و اثر pH در کاربرد اسید سیتریک باشد؛ چرا که اسید سیتریک در مقایسه با سیترات سدیم می‌تواند با تاثیر بر pH بر فراهمی عناصر تاثیرگذار باشد (Chen et al., 2003). طبق گزارش اعتمادیان و همکاران (Etemadian et al., 2018) کاربرد اسیدهای آلی در خاک‌ها منجر به کاهش سریع pH خاک‌ها می‌شود و این کاهش به غلظت اسید، درجه تفکیک یونی اسیدها، آنیون همراه و رفتار بیوشیمیایی آن‌ها در خاک بستگی دارد. در مطالعات انجام شده توسط گرای و همکاران (Gray et al., 2006) بر روی کادمیم در خاک گزارش شده است که تاثیرگذاری اسیدهای آلی بر واجذب این فلزات در pH های بالاتر کمتر بود. در این تحقیق نیز به نظر می‌رسد که آهکی بودن خاک و همچنین نیمه عمر کم سیترات (۶-۲ ساعت) (Van Hees et al., 2003) باعث شده تا اثرگذاری آن در مقایسه با سایر کلات کننده‌ها کمتر باشد. سرعت تجزیه پذیری بالای اسید سیتریک و در نتیجه کارایی کمتر آن در مقایسه با EDTA با نیمه عمر بیش از ۲۰ روز بر فراهمی عناصر سنگین بوسیله ون و همکاران (Wen et al., 2009) نیز گزارش شده است. علاوه بر این در بیشتر تحقیقات عمدتا از اسید سیتریک استفاده شده است که دارای pH پایینی است و به نظر می‌رسد که کاهش pH نقش اصلی در تاثیرگذاری این کلات کننده داشته باشد. در حالی که برای از بین بردن اثر pH در این تحقیق از سیترات سدیم استفاده شد تا تنها نقش کلات کنندگی آن بررسی شود.

اسید هیومیک با دارا بودن گروه‌های عاملی مانند کربوکسیل و OH فنلی می‌تواند در انتقال، زیست فراهمی و حلالیت عناصر سنگین نقش داشته باشد (Hofrichter and Steinbuchel, 2001; Lagier et al., 2000). اگرچه مطالعات زیادی نشان می‌دهد که استفاده از اسید هیومیک در خاک‌های آلوده باعث افزایش فراهمی زیستی و تحرک فلزات می‌شود (Pizzeghello et al., 2013; Rasouli-Sadaghiani et al., 2019; Topcuoglu, 2012)، با این حال برخی دیگر نشان می دهند که مواد آلی با ایجاد کمپلکس با یون‌های فلزی می تواند منجر به تثبیت آن‌ها شود (Rong et al., 2020; Zhang et al., 2013). برونا آلیس گومز و همکاران (Bruna Alice Gomes et al., 2016) عنوان کردند که با استفاده از اسید هیومیک در خاک می‌توان محتوای فلزات سنگین محلول و محتوای فرم آلی مس، کادمیم، روی و سرب را کاهش داد تا فعالیت، سمیت و زیست فراهمی آن‌ها در خاک کاهش یابد.

نتایج تجزیه واریانس تاثیر نوع کلات کننده، نوع و غلظت بیوسورفکتانت نشان دهنده عدم معنی‌داری اثر ساده غلظت بیوسورفکتانت و اثر متقابل نوع کلات‌کننده و غلظت بیوسورفکتانت بر فراهمی کادمیم بود.



شکل ۴- اثر متقابل غلظت و نوع کلات کننده بر غلظت کادمیم محلول (نسبت خاک به محلول: ۱ به ۵، زمان: ۷۲ ساعت)

Figure 4- Interaction effect of concentration and type of chelator on the concentration of soluble cadmium (soil / solution ratio: 1:5, time: 72 hours)

نتایج اثرات سه گانه نوع و غلظت بیوسورفکتانت و نوع کلات-کننده بر مقدار کادمیم محلول در جدول ۱ آورده شده است. کلات کننده‌های EDTA و اسید هیومیک در همه سطوح کاربرد بیوسورفکتانت موجب افزایش معنی‌دار غلظت کادمیم محلول نسبت به تیمار شاهد و سیترات سدیم شدند؛ در حالی که استفاده از سیترات سدیم به تنهایی و همراه با بیوسورفکتانت تاثیر معنی‌داری در غلظت کادمیم محلول نسبت به شاهد ایجاد نکردند. کاربرد سورفکتانتهای تولید شده توسط *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas putida* در هیچ کدام از غلظتهای مورد استفاده بر افزایش کادمیم محلول در تیمارهای شاهد و سیترات سدیم معنی‌دار نبود. بیشترین مقدار کادمیم محلول در نتیجه کاربرد سورفکتانت *Bacillus subtilis* و کلات کننده EDTA به دست آمد. با این حال افزایش غلظت سورفکتانت *Bacillus subtilis* از ۲۵ به ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر تاثیر معنی‌داری بر افزایش کارایی کلات کننده EDTA نداشت. سورفکتانت حاصل از *Pseudomonas putida* در هیچ یک از سطوح استفاده شده تاثیر معنی‌داری بر کادمیم محلول در کاربرد EDTA نداشت. در حالی که در همراه با اسید هیومیک استفاده از سورفکتانت *Pseudomonas putida* در بالاترین غلظت (۱۰۰ میلی گرم در لیتر) در مقایسه با عدم کاربرد آن (غلظت صفر) موجب افزایش معنی دار غلظت کادمیم محلول شد. این نتایج نشان می‌دهد که به دلیل ساختار شیمیایی متفاوت کلات‌کننده‌ها و بیوسورفکتانت‌ها، نوع و غلظت بیوسورفکتانت تاثیر متفاوتی بر افزایش عملکرد کلات کننده‌های مختلف دارد. کاربرد بیوسورفکتانت‌ها در افزایش تاثیر کلات کننده‌ها و ترکیبات افزایش دهنده فرم فراهم عناصر سنگین در برخی مطالعات گزارش شده است. گوناواردانا و همکاران (Gunawardana *et al.*, 2011) گزارش کردند که استفاده همزمان از EDDS، بیوسورفاکتانت رمنولیپید[1] و اسید سیتریک باعث افزایش فراهمی مس، کادمیم سرب و انتقال مقدار قابل توجهی از آنها به ساقه گیاه چچم (*Lolium perenne*) شد. علاوه بر نوع بیوسورفکتانت غلظت آن نیز عامل مهم دیگری در کارایی این مواد است. مولیگان و همکاران (Mulligan *et al.*, 2001) حذف بیشتر عنصر روی در سطح ۲ درصد بیوسورفکتانت را گزارش کردند که غلظت بالایی از بیوسورفکتانت در مقایسه با مطالعه حاضر می‌باشد. تفاوت در نتایج به دست آمده از تحقیقات مختلف در مورد تاثیر بیوسورفکتانت بر فراهمی عناصر سنگین می‌تواند تحت تاثیر نوع خاک، شرایط آزمایش و غلظت و نوع بیوسورفکتانت متفاوت باشد. ون و همکاران (Wen *et al.*, 2009) گزارش کردند که رامنولیپید در خاک به خوبی می‌تواند باعث افزایش فراهمی فلزات سنگین Cd و Zn در روش‌های مختلف پالایش شود. تاثیر مثبت بیوسورفکتانت دی رامنولیپید تولید شده توسط *Pseudomonas aeruginosa* BS2 در پالایش خاک آلوده به فلزات سنگین توسط جاوارکار و همکاران (Juwarkar *et al.*, 2008) نیز گزارش شده است. در مطالعه‌ای اثر دی‌رامنولیپید (di-rhamnolipid) در حذف کروم، سرب، کادمیم و مس از خاک، در یک مطالعه ستونی بررسی شد و نتایج نشان داد که کاربرد محلول ۰/۱ درصد بیوسورفکتانت دی‌رمنولیپید موجب حذف فلزات سنگین از خاک به ترتیب به صورت Cd = Cr> Pb = Cu> Ni شد. تحقیقات نشان داده است که افزودن محلول سورفکتانت در فرآیندهای الکتروکینتیک می تواند تحرک آلاینده ها و فلزات سنگین را افزایش دهد (Saichek and Reddy, 2005). نتایج حاصل از تحقیق لیما و همکاران (Lima *et al.*, 2011) نشان داد که بیوسورفکتانت‌ها می‌توانند با موفقیت برای حذف همزمان یون‌های فلزات سنگین و آلاینده‌های آلی از خاک آلوده به آلاینده های نفتی استفاده شوند. همچنین گزارش شده است که استفاده از لیپوپیتیدهای حاصل شده از گونه‌های مختلف باکتری باعث حذف کادمیم و فنانترن از خاک آلوده شده است. برخی مطالعات نشان می‌دهد که بیوسورفکتانت‌ها در حذف آرسنیک از خاک‌های آلوده تحت شرایط قلیایی کارایی دارند (Wang and Mulligan, 2009).

علاوه بر اثراتی که بیوسورفکتانت‌ها بر ویژگی‌های محلول خاک می‌گذارند، بیوسورفکتانت‌های آنیونی دارای بار منفی مانند رامنولیپید و لیپوپتید با ایجاد پیوند با فلزاتی مانند کادمیم می‌توانند موجب افزایش فراهمی آنها و ورودشان به فاز محلول شوند. با این حال ویژگی‌های فلز، ویژگی‌های خاک، تفاوت ساختاری و ویژگی‌های شیمیایی بیوسورفکتانت‌ها از جمله حلالیت، قدرت امولسیون کنندگی، تاثیر بر کشش سطحی و کمپلکس کنندگی می‌توانند بر شدت تاثیر بیوسورفکتانت‌ها در افزایش فراهمی فلزات سنگین موثر باشد. علاوه بر این غلظت بیوسورفکتانت از عوامل موثر دیگر است. حداقل غلظت بیوسورفکتانت مورد نیاز برای کاهش حداکثر کشش سطحی آب با عنوان غلظت بحرانی میسل یا CMC[2]، شروع تشکیل میسل در نتیجه همگرایی مولکول‌های بیوسورفکتانت می باشد (Silva *et al.*, 2010). مقدار CMC بستگی به ساختار سورفکتانت، ترکیب، درجه حرارت، قدرت یونی و حضور ترکیبات آلی در محلول‌ها دارد (Fuguet *et al.*, 2005).

1- Rhamnolipids

2- Concentration of Micelle Critical

جدول ۱- اثر متقابل نوع و غلظت بیوسورفکتانت و نوع کلات کننده بر غلظت کادمیم محلول (نسبت خاک به محلول: ۱ به ۵، زمان: ۷۲ ساعت)

Table 1- Interaction effect of type and concentration of biosurfactant and chelator type on the concentration of soluble cadmium (soil / solution ratio: 1:5, time: 72 hours)

نوع کلات کننده Chelator type	باکتری Bacteria	غلظت بیوسورفکتانت Biosurfactant concentration (mg/L)	غلظت کادمیم محلول Soluble cadmium concentration (mg/L)
Control	*Bacillus subtilis*	0	0.218 e
		25	0.285 e
		50	0.333 e
		100	0.485 e
	Pseudomonas putida	0	0.223 e
		25	0.255 e
		50	0.283 e
		100	0.240 e
EDTA	*Bacillus subtilis*	0	11.510 b
		25	12.298 a
		50	12.740 a
		100	12.650 a
	Pseudomonas putida	0	11.510 b
		25	11.433 b
		50	10.985 b
		100	11.043 b
Humic acid	*Bacillus subtilis*	0	3.733 d
		25	4.138 cd
		50	4.020 cd
		100	4.103 cd
	Pseudomonas putida	0	3.733 d
		25	3.995 cd
		50	4.070 cd
		100	4.513 c
Sodium citrate	*Bacillus subtilis*	0	0.215 e
		25	0.235 e
		50	0.233 e
		100	0.180 e
	Pseudomonas putida	0	0.531 e
		25	0.550 e
		50	0.225 e
		100	0.167 e

در غلظت‌های بالاتر از CMC تشکیل میسل‌ها می‌تواند کارایی بیوسورفکتانت در تغییر خواص فیزیکی و شیمیایی محلول و نقش کمپلکس کنندگی آن را تغییر دهد. بنابراین علاوه بر نوع بیوسورفکتانت غلظت آن و ویژگی‌های شیمیایی محلول می‌تواند کاملا بر شدت و چگونگی تاثیر بیوسورفکتانت در فراهمی عناصر سنگین موثر باشد که بررسی تاثیر این عوامل نیازمند مطالعات بیشتر می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که کاربرد کلات کننده‌های اسید هیومیک و EDTA باعث افزایش معنی‌دار کادمیم محلول خاک شدند و در این بین EDTA تاثیر بیشتری بر کادمیم محلول خاک داشت در حالی که سیترات سدیم در هیچ یک از غلظت‌های مورد استفاده از ۰/۱ تا ۲ میلی‌مول در لیتر و در هیچ یک از زمان‌های مورد مطالعه تاثیر معنی‌داری بر کادمیم محلول خاک نداشت. نتایج نشان داد که تاثیر نوع و مقدار سورفکتانت تولید شده توسط باکتری‌های *Pseudomonas putida* و *Bacillus subtilis* بر غلظت کادمیم محلول در کاربرد اسید هیومیک و EDTA و سیترات سدیم متفاوت بود. در مقایسه با عدم استفاده از بیوسورفکتانت، سورفکتانت تولید شده بوسیله *Bacillus subtilis* در غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر همراه با کاربرد EDTA و سورفکتانت تولید شده بوسیله *seudomonas putida* در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر همراه با کاربرد اسید هیومیک تاثیر معنی‌داری بر کادمیم محلول خاک داشتند. مقدار کادمیم محلول در تیمار شاهد و سیترات سدیم در هیچ‌یک از غلظت‌های دو بیوسورفکتانت‌های مورد مطالعه تفاوتی نشان نداد. مطالعات بیشتر در خصوص تاثیر نوع و غلظت بیوسورفکتانت‌ها در خاک‌های مختلف بر فراهمی فلزات سنگین ضروری است. از نتایج استفاده از بیوسورفکتانت و کلات کننده‌ها بر افزایش فراهمی کادمیم می تواند

برای اهداف گیاه پالایی جهت افزایش جذب آن به وسیله گیـاه بهـره برد.

منابع

1. Babaeian E., Homaee M., and Rahnemaie R. 2016. Chelate-enhanced phytoextraction and phytostabilization of lead-contaminated soils by carrot (*Daucus carota*). Archives of Agronomy and Soil Science 62: 339-358. https://doi.org/10.1080/03650340.2015.1060320.
2. Baker A.J.M. 2000. Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: Phytoremediation of Contaminated Soil and Water. Terry N., and Banuelos G.S. (Eds.). CRC Press. Boca Raton. 85-107.
3. Banat I.M. 1995. Biosurfactants production and use in microbial enhanced oil recovery and pollution remediation: a review. Bioresource Technology 51: 1–12. https://doi.org/10.1016/0960-8524(94)00101-6.
4. Barona A., Aranguiz I., and Elias A. 2001. Metal associations in soils before and after EDTA extractive decontamination: implications for the effectiveness of further cleanup procedures. Environmental Pollution 113: 79–85. https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00158-5.
5. Berreuter H., Charzinski J., and Scherer S. 2002. Intraspecific diversity of Brevibacterium linens, Corynebacterium glutamicum and Rhodococcus erythropolis based on partial 16S rDNA sequence analysis and Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. Microbiology 148: 1523-1532. https://doi.org/10.1099/00221287-148-5-1523.
6. Broos K., Beyens H., and Smolders E. 2005. Survival of rhizobia in soil is sensitive to elevated zinc in the absence of the host plant. Soil Biology and Biochemistry 37: 573–579. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.08.018.
7. Bruna Alice Gomes D.M., Mottal F.L., and Andrade Santana M.H. 2016. Humic acids: Structural properties and multiple functionalities for noveltechnological developments. Materials Science and Engineerinn C 62: 967-974. https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.001.
8. Chen Y.X., Li Q., Luo Y.M., He Y.F., Zhen, S.J., Yu, Y.L., Tian, G.M., and Wong, M.H. 2003. The role of citric acid on the phytoremediation of heavy metal contaminated soil. Chemosphere 50: 807-811. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00223-0.
9. Das P., Mukherjee S., and Sen R. 2008. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derivedfrom a marine *Bacillus circulans*. Journal Applied Microbiology 104: 1675-1684. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03701.x.
10. Etemadian M., Hassani A., Nourzadeh Haddad M., and Hanifei M. 2018. Effect of organic and inorganic acids on the release of nutrients in calcareous soils. Journal of Water and Soil Conservation 24: 73-91. (In Persian with English abstract). 10.22069/jwsc.2017.12528.2723.
11. Fuguet E., Ràfols C., Rosés M., and Bosch E. 2005. Critical micelle concentration of surfactant in aqueous buffered and unbuffered systems. Analytica Chimica Acta 548: 95-100. https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.05.069.
12. Gautam K.K., and Tyagi V.K. 2006. Microbial surfactants: a review. Journal of Oleo Science 55: 155-166. https://doi.org/10.5650/jos.55.155.
13. Gee G.W., and Bauder J.W. 1979. Particle size analysis by hydrometer, a simplified method for routine textural analysis and a sensivity test of measurement parameters. Soil Science Society of America Journal 43: 1004-1007. https://doi.org/10.2136/sssaj1979.03615995004300050038x.
14. Gray C.W., Dunham S.J., Dennis P.G., Zhao F.J. and McGrath S.P. 2006. Fields evaluation of in situ remediation of a heavy metal contaminated soil using lime and red-mud. Environmental Pollution 142: 530-539. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.10.017.
15. Gunawardana B., Singhal N., and Johnson A. 2011. Effects oF amendments on copper, cadmium and lead phytoextraction by *Lolium perenne* from multiple-metal contaminated solution. International Journal of Phytoremediation 13: 215–232. https://doi.org/10.1080/15226510903567448.
16. Hofrichter M., and Steinbuchel A. 2001. Biopolymers. Vol. 1: Lignin, humic substances and coal. Wiley Europe-V CH, Weinheim, New York.
17. Hosseini S.S., Lakzia A., and Halajnia A. 2017. Effect of EDTA and Citric acid on soil enzyme activities and phytoextraction of lead by sun flower and Indian mustard from a contaminated soil. Journal of Water and Soil Conservation 24: 47-65. (In Persian with English abstract). 10.22069/jwfst.2017.12039.2655.
18. Juwarkar A.A., Dubey K.V., Nair A., and Singh S.K. 2008. Bioremediation of multi-metal contaminated soil using biosurfactant-a novel approach. Indian Journal of Microbioogyl 48: 142-146. https://doi.org/10.1007/s12088-008-0014-5.
19. Lagier T., Feuillade G., and Matejka G. 2000. Interactions between copper and organic macromolecules: determination of conditional complexation constants. Agronomie 20: 537-546. https://doi.org/10.1051/agro:2000148.

20. Lambrechts T., Gustot Q., Couder E., Houben D., Iserentant A., and Lutts S. 2011. Comparison of EDTA-enhanced phytoextraction and phytostabilisation strategies with Lolium perenne on a heavy metal contaminated soil. Chemosphere 85: 1290-1298. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.07.034.
21. Lima T.M.S., Procópio L.C., Brandão F.D., Leão B.A., Tótola M.R., and Borges A.C. 2011. Evaluation of bacterial surfactant toxicity towards petroleum degrading microorganisms. Bioresoure Technology 102: 2957-2964. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.109.
22. Loeppert R.H., and Suarez D.L. 1996. Carbonate and Gypsum, Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods. Soil Science Society of America, Madison. https://doi.org/10.2136/sssabookser5.3.c15.
23. Luo C., Shen Z., and Li X. 2005. Enhanced phytoextraction of Cu, Pb, Zn and Cd with EDTA and EDDS. Chemosphere 59: 1-11. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.09.100.
24. Makkar R.S., Cameotra S.S., and Banat I.M. 2011. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. Applied Microbiology and Biotechnology 1: 1-19. https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-5.
25. Muhammad D., Chen F., Zhao G., and Wu F. 2009. Comparison of EDTA and Citric-acid- enhanced phytoextraction of heavy metals in artificially metal contaminated soil by Typha angustifolia. International Journal of Phytoremediation 11: 558-574. https://doi.org/10.1080/15226510902717580.
26. Mulligan C.N., Yong R.N., and Gibbs B.F. 2001. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. Engineering Geology 60: 371-380. https://doi.org/10.1016/S0013-7952(00)00117-4.
27. Nowack B., Schulin R., and Robinson B.H. 2006. Critical assessment of chelantenhanced metal phytoextraction. Environmental Science & Technology 40: 5225-5232. https://doi.org/10.1021/es0604919.
28. Patowary R., Patowary K., Kalita M.C., and Deka S. 2018. Application of biosurfactant for enhancement of bioremediation process of crude oil contaminated soil. International Biodeterioration and Biodegradation 129: 50-60. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.01.004.
29. Phulpoto I.A., Liang H., Yu Z., Hu B., Wang Y., Ndayisenga F., Li J., and Qazi M.A. 2020. Production and characterization of surfactin-like biosurfactant produced by novel strain Bacillus nealsonii S2MT and its potential for oil contaminated soil remediation. Microbial Cell Factories 19: 145-157. https://doi.org/10.1186/s12934-020-01402-4.
30. Pizzeghello D., Francioso O., Ertani A., Muscolo A., and Nardi S. 2013. Isopentenyladenosine and cytokinin-like activity of different humic substances. Journal of Geochemical Exploration 129: 70-75. https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2012.10.007.
31. Pornsunthorntawee O., Wongpanit P., Chavadej S., Abe M., and Rujiravanit R. 2008. Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by Pseud*omonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil. Bioresource Technology 99: 1589-1595. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.020.
32. Rasouli-Sadaghiani M.H., Karimi H., Ashrafi Saeidlou S., and Khodaverdiloo H. 2019. The Effect of Humic Acid on the Phytoremediation Efficiency of Pb in the Contaminated Soils by Wormwood Plant (*Artemicia absantium*). Journal of Water and Soil Science (Science and Technology of Agriculture and Natural Resources) 22: 261-278. (in Persian with English abstract). 10.29252/JSTNAR.22.4.261.
33. Robinson B.H., Brooks R.R., Howes A.W., Kirkman J.H., and Gregg P.E.H. 1997. The potential of the high biomass nickel hyper accumulator *Berkheya coddii* for phytoremediation and phytomining. Journal of Geochemical Exploration 60: 115-126. https://doi.org/10.1016/S0375-6742(97)00036-8.
34. Rong Q., Zhong K., Huang H., Li C., Zhang C., and Nong X. 2020. Humic acid reduces the available cadmium, copper, lead, and zinc in soil and their uptake by Tobacco. Applied Sciences 10: 1-12. https://doi.org/10.3390/app10031077.
35. Rosa C.F.C., Freire D.M.G., and Ferraz E.C. 2015. Biosurfactant microfoam: Application in the removal of pollutants from soil. Journal of Environmental Chemical Engineering 3: 89-94. https://doi.org/10.1016/j.jece.2014.12.008.
36. Saichek R.E., and Reddy K.R. 2005. Surfactant-enhanced electrokinetic remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in heterogeneous subsurface environments. Journal of Environmental Engineering and Science 4: 327-339. https://doi.org/10.1139/s04-064.
37. Silva S., Farias C., Rufino R., Luna J., and Arubbo L. 2010. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa UCP0992*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 79: 174-183. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.03.050.
38. Sun W., Zhu B., Yang F., Dai M., Sehar S., Peng C., Ali I., Naz I. 2021. Optimization of biosurfactant production from *Pseudomonas sp. CQ2* and its application for remediation of heavy metal contaminated soil. Chemosphere 265. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129090.
39. Taheripur A., Kiani Sh., and Hosseinpur A. 2016. Effect of EDTA and citric acid on phytoextraction of copper and zinc from a naturally contaminated soil by maize (*Zea mays* L.) cultivars. Journal of Water and Soil 29: 1493-1505. (In Persian with English abstract)

40. Tiehm A. 1994. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. Applied Environmental Microbiology 60: 258-263. https://doi.org/10.1128/aem.60.1.258-263.1994
41. Topcuoglu B. 2012. The influence of humic acids on the metal bioavailability and phytoextraction efficiency in longterm sludge applied soil. Conference on International Research on Food Security. Natural Resource Management and Rural Development. Tropentag. Gottingen. Germany.
42. Turgut C., Pepe M.K, and Cutright T.J. 2004. The effect of EDTA and citric acid on phytoremediation of Cd, Cr, and Ni from soil using Helianthus annuus. Environmental Pollution 131: 147-154. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.01.017.
43. Van Hees P.A.W., Jones D.L., and Godbold D.L. 2003. Biodegradation of low molecular weight organic acids in a limed forest soil. Water, Air and Soil Pollution 3: 121-144. https://doi.org/10.1023/A:1024127514103.
44. Volkering F., Breure A.M., and Rulkens W.H. 1998. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. Biodegradation 8: 401-417. https://doi.org/10.1023/A:1008291130109.
45. Walkley A., and Black I.A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. Soil Science 37: 29-38. 10.1097/00010694-193401000-00003.
46. Wang S., and Mulligan C.N. 2009. Arsenic mobilization from mine tailings in the presence of a biosurfactant. Applied Geochemistry 24: 928-935. https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2009.02.017.
47. Wang Z., Shan X.Q., and Zhang S. 2002. Comparison between fractionation and bioavailability of trace elements in rhizosphere and bulk soils. Chemosphere 46: 1163-1171. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00206-5.
48. Wei Z., Wang J.J., Meng Y., Li J., Gaston L.A., Fultz L.M., and DeLaune R.D. 2020. Potential use of biochar and rhamnolipid biosurfactant for remediation of crude oil-contaminated coastal wetland soil: Ecotoxicity assessment, Chemosphere 253: 1-9. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126617.
49. Wen J., Stacey S.P., McLaughlin M.J., and Kirby J.K .2009. Biodegradation of rhamnolipid, EDTA and citric acid in cadmium and contaminated soils. Soil Biology and Biochemistry 41: 2214-2221. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.08.006.
50. Zhang T.H., Wei X.H., Yang B., Xia J.M., Liu C.Y., and Qiu R.L. 2014. Influence of the selective EDTA derivative phenyldiaminetetraacetic acid on the speciation and extraction of heavy metals from a contaminated soil. Chemosphere 109: 1-6. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.039.
51. Zhang Y., Yang X., Tian S., Guo W., and Wang J. 2013. The influence of humic acids on the accumulation of lead and cadmium in tobacco leaves grown in different soils. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 13: 43-53. http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162013005000005.